

Alay F. et al., Orta Karadeniz Bölgesinden Toplanan *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea*, *Trifolium repens* Genotiplerinin Çekirdek DNA İçeriklerinin Belirlenmesi ve Ploidi Analiziyle Tür Teşhisinde Kullanılması. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021. 4(2): p. 274- 294.
DOI: 10.38001/ ijlsb.789825

Orta Karadeniz Bölgesinden Toplanan *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea*, *Trifolium repens* Genotiplerinin Çekirdek DNA İçeriklerinin Belirlenmesi ve Ploidi Analiziyle Tür Teşhisinde Kullanılması

Fatih Alay^{1*}, Kadir İspirli¹, Necda Çankaya¹, İlknur Ayan^{2*}

ÖZET

Bu çalışma, Orta Karadeniz Bölgesi doğal florasından toplanan domuz ayrığı (*Dactylis glomerata* ssp.), kamışsı yumak (*Festuca arundinacea* ssp.) ve ak üçgül (*Trifolium repens* ssp.) popülasyonlarının çekirdek DNA içeriklerinin flow sitometri yöntemiyle belirlenmesi ve ploidi analizi ile tür teşhisinde kullanılması amacıyla yürütülmüştür. Proje kapsamında ak üçgülden mera tipi 80, domuz ayrığından ot ve mera tipi 80 ve kamışsı yumaktan ot, mera ve çim tipi 130 adet genotip kullanılmıştır. Analizlerde tarlada yetişmekte olan bitkilerden alınan taze yaprak dokuları kullanılmıştır. Floresan boya olarak ise propidium iodide kullanılmıştır. İnternal standard, *Dactylis glomerata* ve *Trifolium repens* genotiplerinde *Vicia sativa*, *Festuca arundinecea* genotiplerinde ise *Hordeum vulgare* kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çalışmada kullanılan *Dactylis glomerata* genotiplerinin ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 9.12 pg (8.32 pg-9.66 pg); *Trifolium repens* genotiplerinin ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 2.33 pg (2.22 pg-2.44 pg); *Festuca arundinecea* genotiplerinin ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 17.47 pg (17.02 pg-17.98 pg) arasında değiştiği belirlenmiştir. Çekirdek DNA içerikleri ile genotiplerin ploidi düzeylerini ilişkilendirmek amacıyla yapılan kromozom sayımlarında domuz ayrığı genotiplerinin $2n=4x=28$, ak üçgül genotiplerinin $2n=4x=32$ ve kamışsı yumak genotiplerinin $2n=6x=42$ kromozoma sahip oldukları belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre çalışmada kullanılan *Dactylis* ve *Trifolium* genotiplerinin tetraploid, *Festuca* genotiplerinin ise hekzaploid olduğu saptanmıştır. Ayrıca çalışmada kullanılan tüm genotipler çekirdek DNA içeriklerinin de yardımıyla taksonomik olarak teşhis edilmiş ve *Trifolium repens* ssp.'nin *Trifolium repens* var. *repens*, *Dactylis glomerata* ssp.'nin *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* ve *Festuca arundinecea* ssp.'nin de *Festuca arundinacea* subsp. *arundinacea* olduğu ve genotiplerin içerisinde başka türlere ait hiç bir genotipin bulunmadığı belirlenmiştir.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

30 Ekim 2020

Kabul

15 Mart 2021

ANAHTAR KELİMELELER

Festuca arundinecea,
Dactylis glomerata,
Trifolium repens,
Flow sitometri,
Ploidi

¹ Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, Black Sea Agricultural Research Institute. Samsun, Turkey

² Samsun Ondokuz Mayıs University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, Samsun / Turkey

*Corresponding Author: Fatih Alay, e-mail: fatih_alay@hotmail.com

Use in Species Identification by Ploidy Analysis and Determination of Core DNA Contents of genotypes of *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea* and *Trifolium repens* Collected from the Central Black Sea Region

ABSTRACT

This study was carried out for the purpose to the determination of the nuclear DNA contents by flow cytometry method and its use in species identification with ploidy analysis of the populations of *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea* and *Trifolium repens* collected from the natural flora of the Central Black Sea Region. Pasture type 80 from *T. repens*, hay and pasture type 80 from *D. glomerata* and grass, pasture and hay type 130 from *F. arundinacea* genotypes were used. Fresh leaf tissues from plants growing in the field were used in the analysis. Propidium iodide was used as fluorescent dye. Used *Hordeum vulgare* in *Festuca arundinacea* genotypes and *Vicia sativa* in *Dactylis glomerata* and *Trifolium repens* genotypes as internal standard. According to the results obtained average 2C core DNA content of *Dactylis glomerata* genotypes 9.12 pg (8.32 pg-9.66 pg); average 2C core DNA content of *Trifolium repens* genotypes 2.33 pg (2.22 pg-2.44 pg); average 2C core DNA content of *Festuca arundinacea* genotypes 17.47 pg (17.02 pg-17.98 pg) was determined. Chromosome counts were performed to correlate the core DNA contents with the ploidy levels of genotypes. $2n = 4x = 28$ of *D. glomerata* genotypes and $2n = 4x = 32$ of *T. repens* genotypes and $2n = 6x = 42$ of *F. arundinacea* genotypes was determined to have chromosomes. According to these results, tetraploid of *Dactylis* and *Trifolium* genotypes and hekaploid of *Festuca* genotypes were determined to be. In addition, all the genotypes used in the study were taxonomically diagnosed with the help of the core DNA contents and *Trifolium repens* var. *repens* of *Trifolium repens* ssp., *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* of *Dactylis glomerata* ssp. and *Festuca arundinacea* subsp. *arundinacea* of *Festuca arundinacea* ssp. was founded. It was determined that genotypes did not contain any genotypes of other species.

ARTICLE HISTORY

Received

30 October 2020

Accepted

15 March 2021

KEY WORDS

Festuca arundinacea,
Dactylis glomerata,
Trifolium repens,
Flow Cytometry,
Ploidy

Giriş

Ülkemizin uzun yıllardır çözilemeyen en ciddi tarımsal sorunlarından birisi de, kaliteli kaba yem üretiminin yetersiz oluşudur. Bu durum hayvansal gıda üretim girdilerinin artmasıyla birlikte hayvansal ürün fiyatlarının halkımızın alım gücünün üzerinde gerçekleşmesine sebep olmaktadır. Diğer taraftan küçük üreticiler zarar ettiklerinden hayvanlarını kesime sevk ederek üretim faaliyetlerini durdurmak zorunda kalmaktadırlar. Bu nedenle ülkemizde canlı hayvan ve et ithalatı son yıllarda artmıştır.

Ülkemizde kaliteli kaba yem üretimini artırmanın en önemli yolları; meraların ıslah edilerek üretim kapasitelerinin artırılması ve tarla tarımı içerisinde yem bitkileri ekiliş alanlarının artırılmasıdır. Mera alanlarının ıslah edilmesi ve yem bitkisi ekiliş alanlarının genişletilmesiyle birlikte farklı bölgeler için yüksek verim ve kaliteye sahip farklı yem bitkisi türlerine/çeşitlerine olan talep artacaktır. Ancak ülkemizde tescilli yerli ve milli

yem bitkisi tür ve çeşidi sayısı son derece azdır. Bu nedenle ülkemizin farklı bölgeleri için lokal şartlara uygun yüksek verim ve kaliteye sahip yem bitkisi çeşitlerinin geliştirilmesine yönelik ıslah çalışmalarına hız verilmesi gerekmektedir.

Türkiye’de olduğu gibi, Orta Karadeniz Bölgesi meralarında da yıllardan beri sürdürülen aşırı otlatma ve bilinçsiz kullanım, çayır-mera vejetasyonlarında arzulanan türlerin yok olmasına ve biyolojik çeşitliliğin hızlı bir şekilde daralmasına yol açmaktadır. Ayrıca, bölgenin kıyı kesiminde gittikçe artan yapılaşma sorunu, hem iç hem de kıyı kesim taban meralarında yapılan çim kesme işlemi meraların doğal yapısını bozmaktadır. Zaten hayvanlarımızın ihtiyacı olan kaliteli kaba yemin, ihtiyacı karşılama oranı da yetersizdir [2] . Hem çayır-meraların iyileştirilmesi hem de kaliteli kaba yem üretimi için uygun yem bitkisi türlerinin toplanması, sınıflandırılması ve ıslah projelerine alt yapı oluşturması bakımından gen havuzunun genişletilmesi gerekmektedir [3].

Yabani bitki formları, yeni çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılacak en değerli gen kaynaklarıdır. Orta Karadeniz Bölgesi doğal florası, başta yem bitkileri olmak üzere, bitki türleri ve tür içi çeşitlilik yönünden oldukça zengindir [3]. Orta Karadeniz Bölgesi’nde yem bitkileri tarımında ve çayır-mera ıslahında kullanılacak doğal vejetasyondan seçilip çoğaltılmış ve tescil edilmiş (Albayrak, İlkadım ve Sultan 1919 hariç) herhangi bir çeşit bulunmamaktadır.

Yem bitkisi çeşitlerinin geliştirilmesinde hedef bölgede yetişmekte olan ekotipler son derece büyük bir öneme sahiptir. Bu ekotipler bölgede uzun yıllardır doğal olarak yetişmekte olduklarından bölgeye iyi bir şekilde adapte olmuşlardır. Bundan dolayı lokal ekotipler, yeni çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılacak en değerli gen kaynaklarıdır. Fakat yem bitkisi türlerinde ploidy oldukça değişken olduğundan, aynı tür içerisinde bile diploid-decaploid arasında değişim gösterebilmektedir. Bu nedenle doğadan yeni toplanmış olan yem bitkisi genetik kaynaklarının bir ıslah programına dâhil edilmeden önce ploidy düzeyleri mutlaka belirlenmelidir. Aksi takdirde uyumsuzluk kaynaklı ciddi sorunlar ortaya çıkabilmekte ve ıslah projelerinin başarıya ulaşmasının önünde çok ciddi bir engel oluşturmaktadır [12].

Bitkilerin sahip olduğu tüm kromozomlar hücre çekirdeğinde bulunduğundan, çekirdek DNA miktarı ile ploidi düzeyi arasında sıkı bir doğrusal ilişki vardır. Bu nedenle çekirdek DNA içeriği esasına göre ploidi analizi giderek yaygınlaşmaktadır. Önceleri bitkilerde çekirdek DNA miktarları feulgen mikrospektrofotometri ile belirlenmekteydi. Ancak, son

yıllarda, kolaylığı, hızı ve güvenilirliğinden dolayı flow sitometri ploidi analizlerinde tercih edilen bir metot olmuş ve başarıyla kullanılmaya başlanmıştır [12].

Günümüzde en hassas ve güvenilir metot olan flow sitometri yöntemi ile 290 ekotipin/genotipin çekirdek DNA içerikleri ve ploidi düzeyleri ilk defa belirlenmiştir. Ploidi analizi esnasında flow sitometri ile genotiplerin belirlenen çekirdek DNA içerikleri taksonomik teşhislerinin teyidinde de kullanılmış ve genotipler arasında başka türlere ait bitkilerin bulunup bulunmadığı kontrol edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu ekotiplerin bitki ıslahı programlarına entegrasyonunu kolaylaştıracak ve hızlandıracaktır.

Materyal ve Yöntem

Samsun Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Ambarkörü deneme istasyonunda bulunan kamışsı yumak, domuz ayrığı ve ak üçgül genotipleri Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarına gönderilerek ploidi seviyelerine bakılmış ve kromozom sayımları yapılmıştır.

Daha önce yürütmüş olduğumuz TAGEM /TA/00/11/01/009 nolu ve “Karadeniz Bölgesi Yem Bitkileri Araştırmaları Projesi” kapsamında Samsun, Ordu, Tokat, Amasya ve Sinop illerinden *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea* ve *Trifolium repens* türleri toplanmıştır. Toplam 229 populasyon içerisinde üstün performansları nedeniyle seçilmiş olan 80 adet ak üçgül, 80 adet domuz ayrığı ve 130 adet kamışsı yumak olmak üzere toplam da 290 adet genotipin yaprak dokusu kullanılmıştır. Aynı zamanda her türe ait 5'er adet genotipin kök ucu materyal olarak kullanılmıştır.

Yöntem

Kamışsı yumak ve domuz ayrığının 70x70 cm, ak üçgül'ün ise 100x100 cm olduğu araştırma alanı killi tınlı, organik madde içeriği orta (%1.23), fosfor içeriği çok düşük (2.00 ppm), kireç içeriği (%6.8) orta, tuz (0.027 µmhos/cm) tuzsuz, potasyum içeriği (55 ppm) yetersiz ve 7.35 pH değerinde olduğu ve hafif alkali bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir [1].

Toprak analiz sonuçları dikkate alınarak ak üçgüle tesis yılında dekara 5 kg N, 8 kg P₂O₅; buğdaygillere ise tesis yılında 5 kg N ve 8 kg P₂O₅, 2. ve 3. yıllarda ise erken ilkbaharda 8 kg N olacak şekilde gübreleme yapılmıştır. Temmuz-Ağustos aylarında bitkilerin kuraklık stresini azaltmak için 2-3 kez çok az miktarda yağmurlama sulama yapılmış ve

etkili maddesi Lambda-cyhalothrin olan ilaçla yılda 2 kez mayıs böceğine karşı ilaçlanmıştır. Gerektiğinde yabancı ot mücadelesi yapılmıştır.

Flow sitometri ile çekirdek DNA analizi (pg)

Çekirdek DNA analizi için örnekler, Tuna ve ark. (2016) tarafından açıklanan protokol takip edilerek hazırlanmış ve Tekirdağ Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarında bulunan Partec marka flow sitometri cihazı ile belirlenmiştir.

Yaprak örneklerinin transfer protokolü

Üç türe ait toplam 290 yaprak örneği Samsun Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Ambarköprü deneme arazisinden alınarak Tekirdağ Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümüne aşağıdaki protokole uyularak gönderilmiştir.

- 1-Genç ve sağlıklı bitkilerden 50-60 mg ağırlığında yaprak örnekleri alınmıştır,
- 2-Petri kabına sığacak şekilde 2 tabaka halinde filtre kağıdı hazırlanmıştır,
- 3-Filtre kağıtlarının arasına yaprak numunesi konulmuştur,
- 4-Saf su ile petri kabındaki örnek ıslatıp, fazla su dökülmüştür,
- 5-Petri kabının etrafı iyice kapatılıp, üzerine etiket yapıştırılmış ve numuneyi tanımlayıcı kod verilmiştir,
- 6-Örnekler, içinde buz kalıplarının olduğu yalıtımlı kutu içerisine konulmuş ve transfer edilmiştir.

Çekirdek DNA analizi 2019 bahar aylarında tarlada yetişmekte olan bitkilerden elde edilen taze yaprak dokuları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ak üçgül'den 80, domuz ayrığı'ndan 80 ve kamışsı yumak'tan 130 genotip analiz edilmiştir.

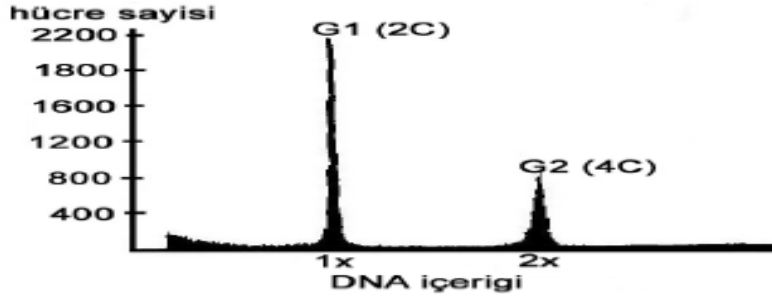
Analizlerde, *Dactylis glomerata* ssp. ve *Trifolium repens* ssp. için standart olarak 2C çekirdek DNA içeriği tarafımızdan 3.65 pg olarak hesaplanmış olan yaygın fiğ (*Vicia sativa*), *Festuca arundinaceae* ssp. için ise standart olarak 2C çekirdek DNA içeriği yine tarafımızdan 10.65 pg olarak hesaplanmış olan arpa bitkisi (*Hordeum vulgare* L.) kullanılmıştır.

Çekirdek DNA izolasyonu için protokol

1. Yaklaşık olarak 0.5 cm² büyüklüğünde taze yaprak dokusu petri kabına konulmuş ve üzerine 500 µl Extraction Buffer ilave edilmiştir.

2. Yaprak dokusu keskin jilet ile 30-60 saniye süresince küçük parçalara ayrılan kadar parçalanmıştır. Bu şekilde hazırlanmış örnek, petri kabı içerisinde hafifçe 10-15 saniye kadar çalkalanmıştır.
3. Çalkalama işleminden sonra 40 saniye kadar petri kabında bekletilen örnek, Partec marka 50 µl CellTrics filtre ile süzülerek tüp içerisine transfer edilmiştir.
4. Tüp içerisine daha önce hazırlanmış 2 ml staining solüyon ilave edilerek hazırlanan örnek ışıksız bir ortamda 30-60 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda örnekler flow sitometri cihazı kullanılarak analiz edilmiştir.

Protokolü takip ederek muamele edilmiş bitki dokusu hücreleri mekanik olarak birbirinden ayrılmış, hücre çekirdekleri serbest kalmış, çekirdek zarı buffer tarafından içerdiği bazı kimyasal maddeler ile tahriş edilmiş ve çekirdek zarı üzerinde açıklıklar (delik) oluşmuştur. Propidium iodide bu açıklıklardan yararlanarak çekirdek içerisine girmiş ve nükleik asitlere bağlanmıştır. Çekirdek DNA içeriği arttıkça çekirdek içerisine giren ve bağlanan PI miktarı da aynı oranda artmıştır. Örneklerin içerisinde bulunan hücre çekirdekleri, analiz sırasında lazer ışığı önünden geçerken içerdiği PI miktarı (dolaylı olarak DNA içeriği) ile doğru orantılı olarak floresan ışığı yaymıştır. Yayılan floresanlar cihazın içerisinde bulunan ilgili bölümlerde bir dizi işlemde geçtikten sonra dijital değerlere dönüşmüş ve bilgisayar monitörüne histogram olarak yansımıştır (Şekil 1).



Şekil 1 Flow sitometri cihazındaki histogram görüntüsü

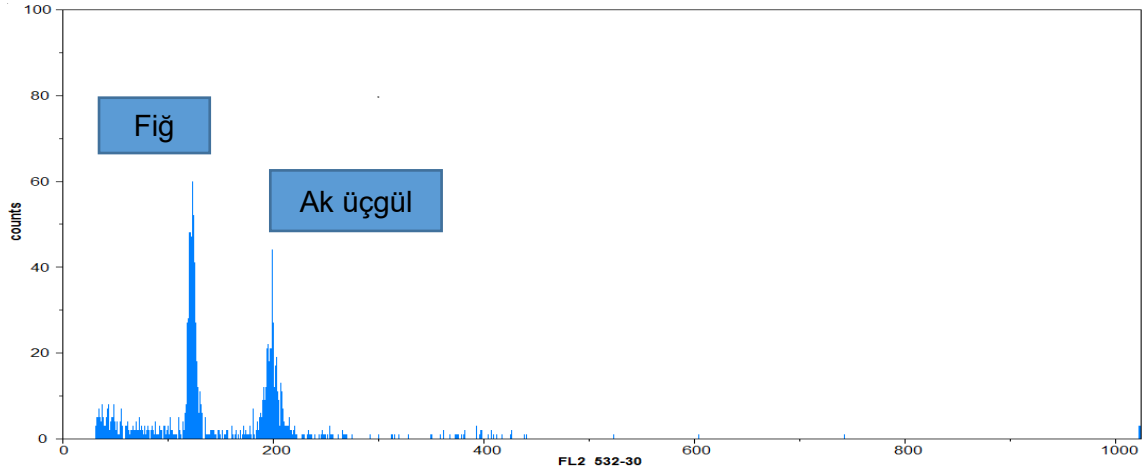
Histogramın dikey eksenini; analiz edilen hücre sayısını, yatay eksenini ise; analiz edilen örneklerin floresan yoğunluğunu göstermektedir. Yatay eksenin sağına doğru gittikçe floresan yoğunluğu dolayısıyla DNA içeriği artmaktadır.

Flow sitometri ile yapılan rutin çekirdek DNA analizlerinde her örnek için yaklaşık 10000 çekirdeğin DNA içeriği belirlenir ve ortalaması analiz edilen örneğin çekirdek DNA içeriği olarak sunulur. Hassas bir analiz için histogram üzerinde bulunan pikler mümkün

olduğunca ince ve uzun olmalıdır. Piklerin şekli flow sitometri cihazını kalibre ederek ve örneği dikkatli hazırlayarak daha kaliteli bir hale getirilebilir.

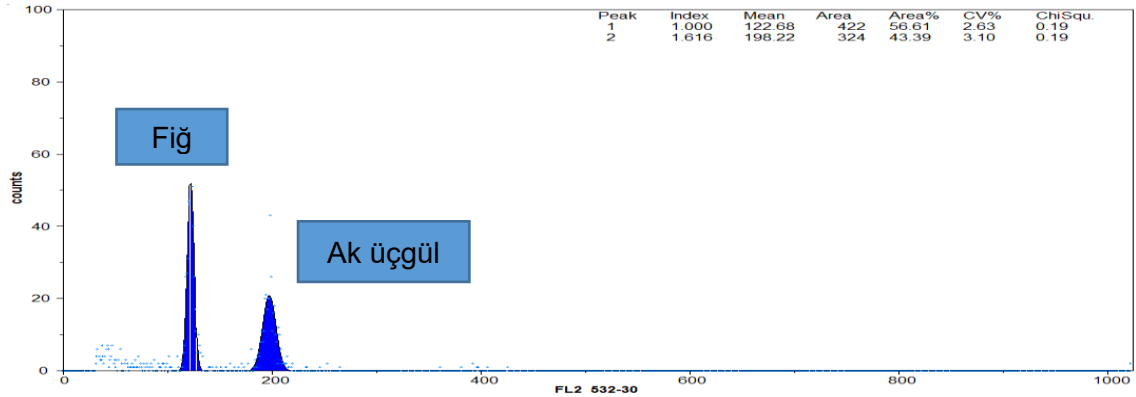
Flow sitometri ile ak üçgülün çekirdek DNA içeriğinin ölçülmesi ve mutlak değerinin hesaplanması

Ak üçgül genotiplerinin çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesi; ak üçgül ve standart olarak kullanılan fiğ bitkisine ait G1 piklerinin floresan yoğunlukları kıyaslanarak yapılmıştır. Yukarıda açıklandığı gibi hazırlanmış bir örnek flow sitometri cihazı ile analiz edildiğinde aşağıdaki flow histogramı elde edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2 Ak üçgül'ün flow sitometri cihazındaki histogram görüntüsü

Cihazın sahip olduğu flow max programı kullanılarak histogram analiz edildiğinde aşağıdaki histograma (Şekil 3) dönüşmektedir.



Şekil 3 Ak üçgülün flow histogramın flow max programı ile analiz edilmesi sonrasındaki görünüşü

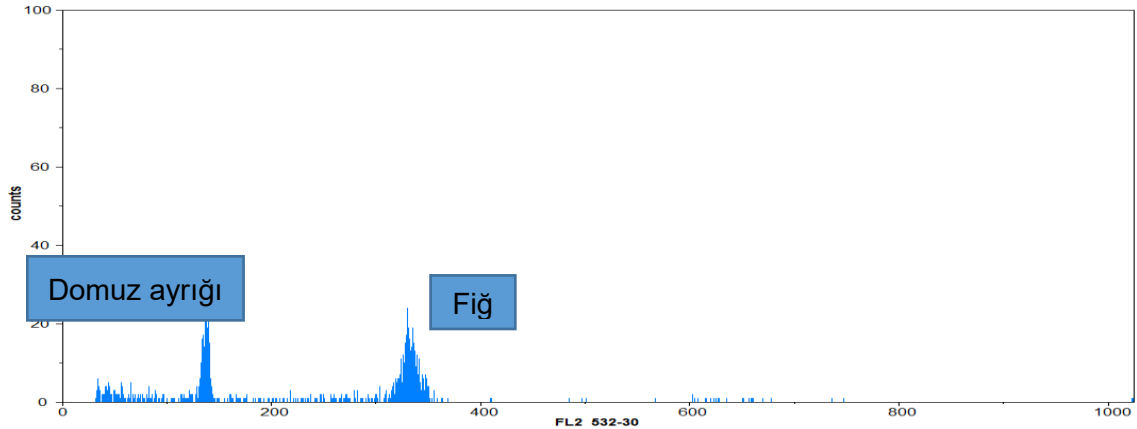
Çalışma kapsamında analiz edilmiş olan her örnek bitkinin ve kullanılan standardın G1 piklerinin floresan yoğunluklarına ait değerler (histogramın sağ üst köşesinde yer alan mean değerleri) kullanılarak aşağıdaki formül aracılığıyla örneklerin çekirdek DNA içerikleri pikogram olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Çekirdek DNA miktarı} = \frac{\text{DNA miktarı bilinmeyen türe ait floresan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)}}{\text{Standarda ait örneğin floresan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)}} \times \text{standardın DNA içeriği}$$

Denkleme göre bir genotipe ait çekirdek DNA miktarı 2.25 pg olarak bulunmuştur. Diğer genotiplerinde çekirdek DNA miktarları bu formülle tek tek hesap edilmiş, ortalama çekirdek DNA miktarı tespit edilmiştir.

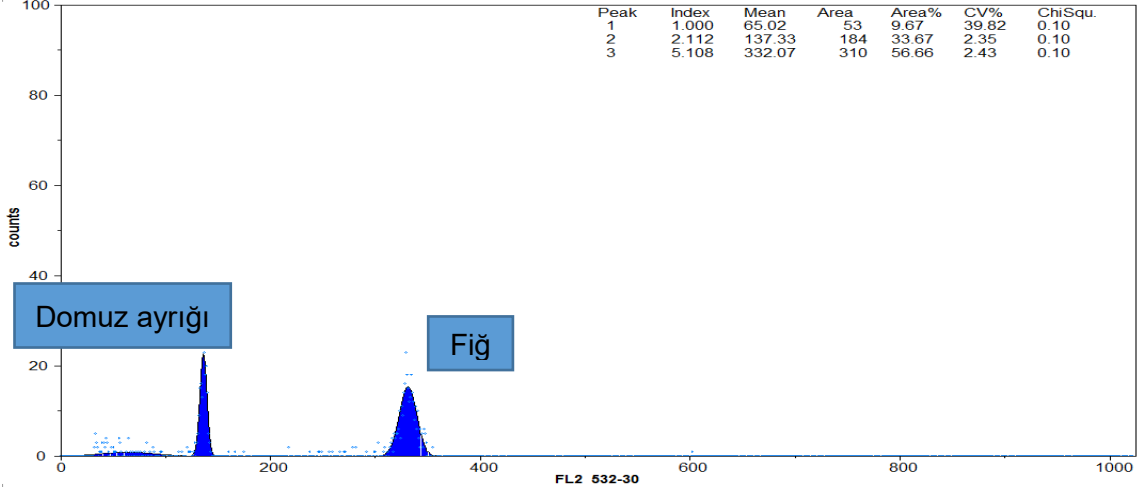
Flow sitometri ile domuz ayrığı'nın çekirdek DNA içeriğinin ölçülmesi ve mutlak değerinin hesaplanması

Domuz ayrığı genotiplerinin çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesi; domuz ayrığı ve standart olarak kullanılan fiğ bitkisine ait G1 piklerinin floresan yoğunlukları kıyaslanarak yapılmıştır. Yukarıda açıklandığı gibi hazırlanmış bir örnek flow sitometri cihazı ile analiz edildiğinde aşağıdaki flow histogramı elde edilmiştir (Şekil 4.).



Şekil 4 Domuz ayrığı'nın flow sitometri cihazındaki histogram görüntüsü

Cihazın sahip olduğu flow max programı kullanılarak histogram analiz edildiğinde histogram aşağıdaki histograma (Şekil 5.) dönüşmektedir.



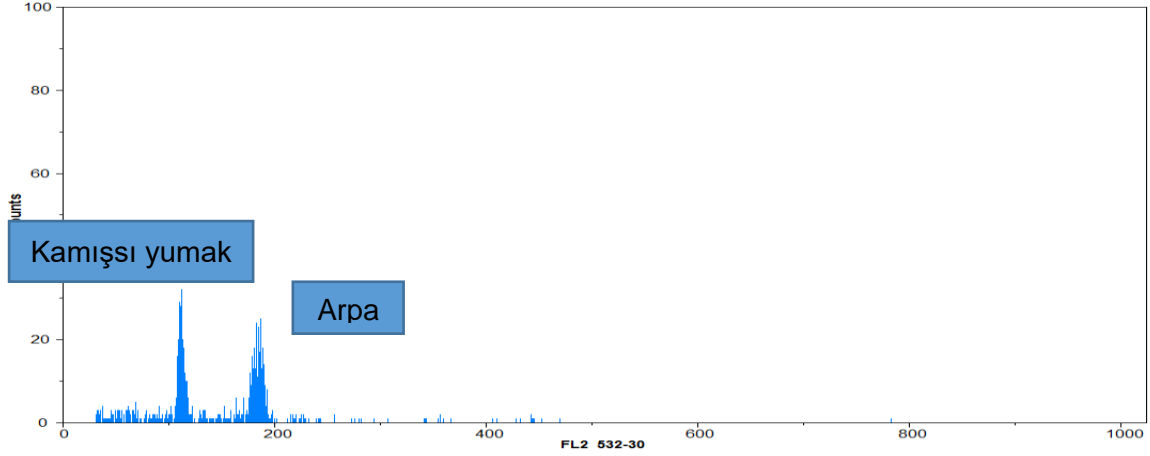
Şekil 5 Domuz ayrığına flow histogramın flow max programı ile analiz edilmesi sonrasındaki görünüşü

Çalışma kapsamında analiz edilmiş olan genotiplerin ve kullanılan standardın piklerine ait floresan yoğunluk miktarları, histogramda verilmiştir. Verilen mean değerleri kullanılarak “Çekirdek DNA Miktarı” nı veren formül vasıtasıyla, örneklerin çekirdek DNA içerikleri hesaplanmıştır.

Denkleme göre bir genotipe ait çekirdek DNA miktarı 8.83 pg olarak bulunmuştur. Diğer genotiplerinde çekirdek DNA miktarları bu formülle tek tek hesap edilmiş, ortalama çekirdek DNA miktarı tespit edilmiştir.

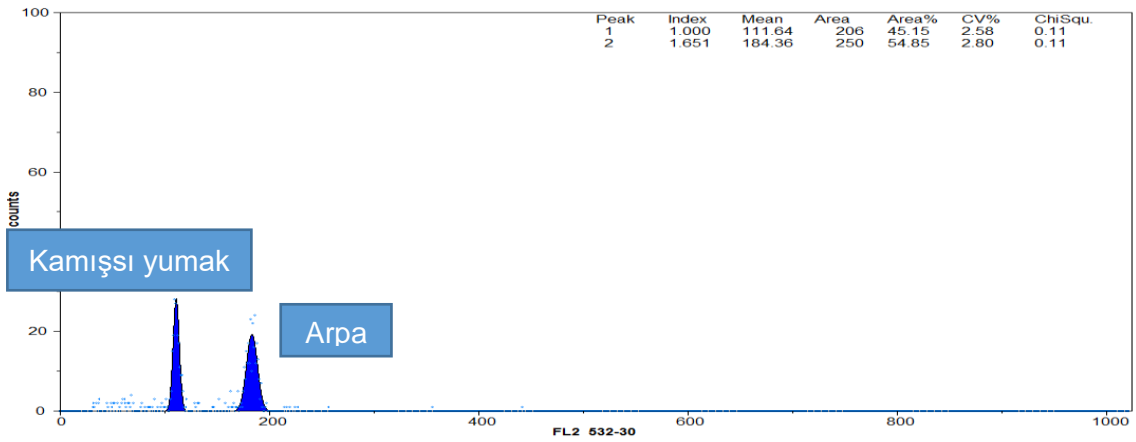
Flow sitometri ile kamışsı yumağın çekirdek DNA içeriğinin ölçülmesi ve mutlak değerinin hesaplanması

Kamışsı yumak genotiplerinin çekirdek DNA içeriklerinin belirlenmesi; kamışsı yumak ve standart olarak kullanılan arpa bitkisine ait G1 piklerinin floresan yoğunlukları kıyaslanarak yapılmıştır. Yukarıda açıklandığı gibi hazırlanmış bir örnek flow sitometri cihazı ile analiz edildiğinde aşağıdaki flow histogramı elde edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6 Kamışsı yumağın flow sitometri cihazındaki histogram görüntüsü

Cihazın sahip olduğu flow max programı kullanılarak histogram analiz edildiğinde aşağıdaki histograma (Şekil 7) dönüşmektedir.



Şekil 7 Kamışsı yumağın flow histogramının flow max programı ile analiz edilmesi sonrasındaki görünüşü

Bu çalışma ile analiz edilmiş olan genotiplerin ve kullanılan standardın G1 piklerinin floresan yoğunluk miktarları, histogramın sağ üst köşesinde verilmiştir. Verilen mean değerleri kullanılarak “Çekirdek DNA Miktarı” nı veren formül vasıtasıyla, genotiplerin çekirdek DNA miktarları hesaplanmıştır.

Denkleme göre bir genotipe ait çekirdek DNA miktarı 17.58 pg olarak bulunmuştur. Diğer genotiplerinde çekirdek DNA miktarları bu formülle tek tek hesap edilmiş, ortalama çekirdek DNA miktarı tespit edilmiştir.

Verilerin deęerlendirilmesi

Ak üçgülden mera tipi 80, domuz ayrığından ot tipi 40, mera tipi 40 ve kamışsı yumaktan ot tipi 40, mera tipi 40 ve çim tipi 50 adet olmak üzere toplam 290 genotip, tür içinde mera, ot ve çim tipi olma özelliğine göre ayrı ayrı tanımlayıcı istatistiğe tabi tutulmuştur. Excel 2016 tanımlayıcı istatistik programı [13] kullanılarak çekirdek DNA içeriklerinin ortalaması, en küçük ve en büyük değerleri ve değişim katsayıları hesaplanmıştır. Ayrıca veriler sadece ilgili olduğu grubun özelliklerini göstereceğinden “ortalama±standart sapma” hesaplanmıştır [6].

Çekirdek DNA içeriği ile ploidi düzeyinin ilişkilendirilmesi

Ak üçgül, domuz ayrığı ve kamışsı yumak genotiplerinin çekirdek DNA içerikleri ile ploidi düzeyleri için her türe ait genotiplerden 5'er adet mitotik kromozomlar, mikroskop altında sayılarak ilişkilendirilmiştir.

Kromozom sayımları Samsun Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Ambarköprü deneme alanından alınarak Tekirdağ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri bölümüne gönderilen klon materyallerden elde edilen kök ucu meristem dokuları kullanılarak hazırlanan preparatlar üzerinde bulunan, iyi dağılmış ve düzgün morfolojiye sahip kromozomlar sayılarak yapılmıştır.

Mitoz kromozomlarının sayılması

Kromozom sayımları kök ucu meristem dokuları kullanılarak Feulgen metoduna göre hazırlanmış olan preparatların ışık mikroskobu altında incelenmesiyle yapılmıştır [6].

Bitki kök uçlarının eldesi

Kök ucu hasadı saksılarda yetiştirilmekte olan ergin bitkilerden bahar aylarında sabah erken saatlerde (9:00-10:00) yapılmış ve sadece saksıların dibinde bulunan beyaz görünümlü hızlı büyüyen kök uçları hasat edilmiştir.

İlk işlem

Hasat edilen kök uçları 24 saat soğuk su (+4 °C) ile muamele edilmiştir.

Materyalin tespiti

24 saat soğuk su muamelesinden sonra kök uçları 3:1 alkol: asetik asit solusyonunda tespit edilmiş ve kullanılabileceği kadar -20 °C de muhafaza edilmiştir.

Hidroliz

Kök uçları 1N HCL ile 60 °C de hidroliz edilmiştir. Hidrolizin süresi 12 ile 20 dakika arasında olup, türe göre değişmektedir.

Feulgen boyaması

Kök uçları hidrolizden sonra, 60-90 dakika Feulgen'de bekletilmiştir. Boyama sonunda kök uçlarının 1-2 mm'lik meristem bölgelerinin koyu viyole rengine boyandığı görülmüştür.

Preparatların hazırlanması

Kök uçlarının koyu viyole rengine boyanan kısımları jilet ile kesilerek lam üzerine alınmış ve bistürü ucu ile ezmek suretiyle lam üzerine yayılmıştır. Dağılmış olan meristem dokusu üzerine 1 damla asetokarmin damlatılarak üzerine lamel kapatılmıştır. Düz bir zemin üzerinde lamelin üzerine başparmak ile bastırıldıktan sonra slayt mikroskop altında incelenmiştir.

Fotoğraf çekimi

Hazırlanan slaytlar Olympus marka BX 51 model mikroskobuna yerleştirildikten sonra, hücrelerin fotoğrafları $10 \times 100 = 1000$ kez büyütülerek spot marka Rt Slider model CCD dijital kamera ile çekilmiştir. Morfolojisi düzgün, iyi dağılmış ve kromozom sayısı tam olan hücrelerin kromozomları sayılmış ve fotoğrafları çekilmiştir.

Taksonomik teşhisler

Çekirdek DNA analizi sonuçlarına göre her tür taksonomik olarak incelenmiş ve teşhis edilmiştir. Saksılara dikilen bitki örnekleri çiçeklenme dönemlerinde teşhise konu olan kısımları dikkate alınarak herbaryum materyali haline getirilmiş, Avrupa ve Sibirya Florasında (Davis 1985) verilen ilgili cins anahtarları kullanılarak teşhisleri gerçekleştirilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Bulgular

Çalışmamızda Orta Karadeniz bölgesinden toplanmış olan *Trifolium repens*, *Dactylis glomerata* ve *Festuca arundinacea* türlerine ait toplam 290 genotipin flow sitometri ile çekirdek DNA miktarları ilk defa başarıyla belirlenmiştir. Kamışsı yumak ot, mera ve çim tipi genotiplerin çekirdek DNA miktarları yakın çıktığı için sadece kamışsı yumak başlığı altında incelenmiştir. Benzer şekilde domuz ayrığı ve ak üçgülde de çekirdek DNA miktarları yakın çıktığı için ak üçgül ve domuz ayrığı başlığı altında aşağıda incelenmiştir.

Ak üçgül (*Trifolium repens*) Çekirdek DNA Miktarları

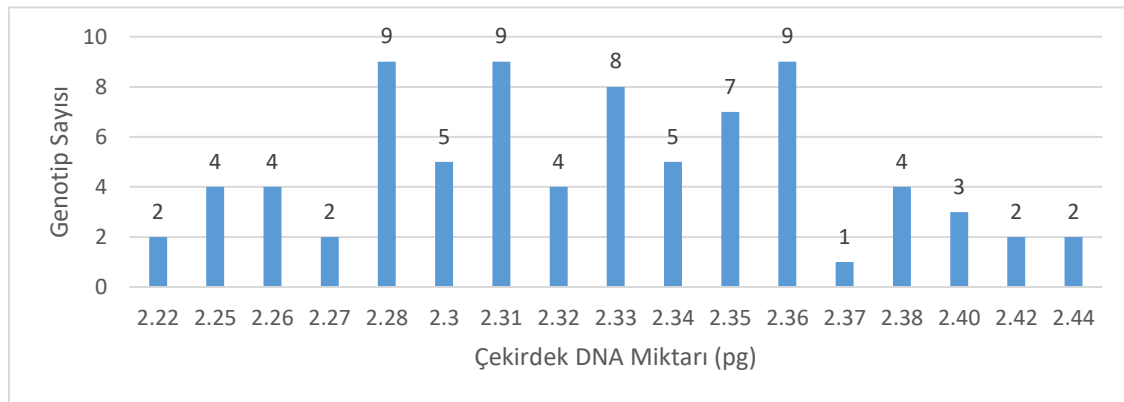
80 adet ak üçgül genotipi analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Trifolium repens* genotiplerinin ortalama çekirdek DNA içeriği 2.33 pg, çekirdek DNA içeriklerinin 2.22-2.44 pg arasında değiştiği, standart sapma değerinin 2.33 ± 0.046 ve değişim katsayısının % 2 olduğu belirlenmiştir. Standart sapma değerinin çok küçük olması, ak üçgül genotiplerinin çekirdek DNA miktarlarının birbirlerine çok yakın olduğunu ve dolayısıyla ploidi düzeylerinin aynı olacağı anlamına gelmektedir.

Tanımlayıcı istatistik neticesinde çekirdek DNA içeriklerinin ortalaması, en küçük ve en büyük değerleri, standart sapmaları ve değişim katsayıları hesaplanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. *Trifolium repens* genotiplerin pikogram olarak tanımlayıcı istatistik değerleri

Tanımlayıcı İstatistik Değerleri	Pg
Ortalama Çekirdek DNA Miktarı	2.33
Standart Sapma	0.046
Çekirdek DNA içeriği En Küçük	2.22
Çekirdek DNA içeriği En Büyük	2.44
Adi Fiğ (standart) Ortalama Çekirdek DNA Miktarı	3.65
Genotip Adedi (n)	80
D.K (Değişim Katsayısı) (%)	2

80 adet *Trifolium repens* mera tipi genotipin, çekirdek DNA miktarına karşılık gelen genotip sayısını gösteren sonuç Şekil 8.'de verilmiştir.



Şekil 8 *Trifolium repens* genotip sayılarına karşılık gelen çekirdek DNA miktarları

38 adet genotipin 2.22-2.32 pg, 8 adet genotipin 2.33 pg ve 34 adet genotipin ise 2.34-2.44 pg arasında değiştiği Şekil 8'de görülmektedir.

Trifolium repens ve standart olarak kullanılan *Vicia sativa* bitkilerine ait G1 piklerinin birbirine göre pozisyonları Şekil 2’de, G1 piklerinin flow sitometri paket programı tanımlanmış hali ise Şekil 3’te verilmiştir.

Domuz ayrığı (*Dactylis glomerata*) Çekirdek DNA Miktarları

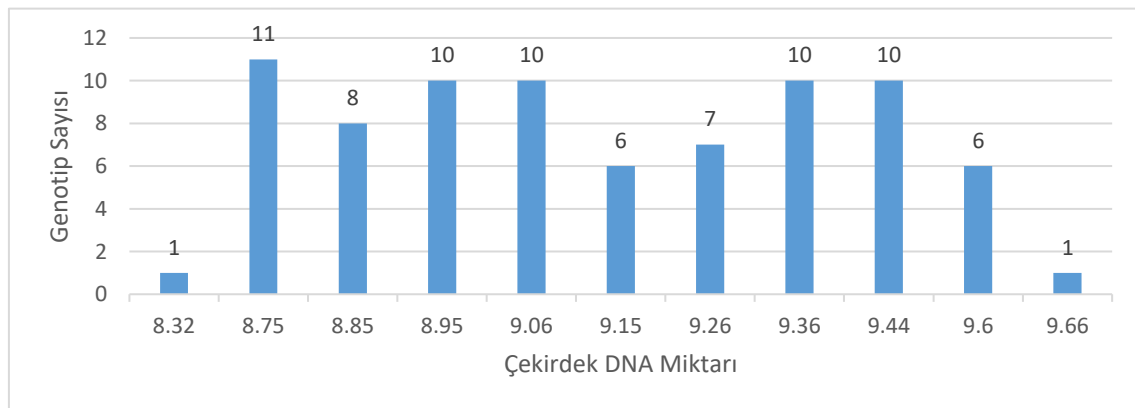
80 adet domuz ayrığı genotipi kullanılmıştır. *Dactylis glomerata* genotiplerinin ortalama çekirdek DNA içeriği 9.12 pg, çekirdek DNA içeriklerinin 8.32-9.66 pg arasında değiştiği, standart sapma değerinin 9.12 ± 0.28 ve değişim katsayısının % 3.1 olduğu tespit edilmiştir. Standart sapma değerinin çok az değişmesi domuz ayrığı genotiplerinin çekirdek DNA miktarının çok yakın olduğunu ve ploidi düzeylerinin aynı olacağı anlamına gelmektedir.

Tanımlayıcı istatistik neticesinde çekirdek DNA içeriklerinin ortalaması, en küçük ve en büyük değerleri, standart sapmaları ve değişim katsayıları hesaplanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. *Dactylis glomerata* genotiplerin pikogram olarak tanımlayıcı istatistik değerleri

Tanımlayıcı İstatistik Değerleri	Pg
Ortalama Çekirdek DNA Miktarı	9.12
Standart Sapma	0.28
Çekirdek DNA içeriği En Küçük	8.32
Çekirdek DNA içeriği En Büyük	9.66
Adi Fiğ (standart) Ortalama Çekirdek DNA Miktarı	3.65
Genotip Adedi (n)	80
D.K (Değişim Katsayısı) (%)	3.1

80 adet *Dactylis glomerata* ot ve mera tipi genotipin, çekirdek DNA miktarına karşılık gelen genotip sayısını gösteren sonuç Şekil 9’da verilmiştir.



Şekil 9 *Dactylis glomerata* çekirdek DNA miktarına karşılık gelen genotip sayıları

1 adet genotipin 8.32 pg, 78 adet genotipin 8.75-9.6 pg arasında ve 1 adet genotipin ise 9.66 pg olduğu Şekil 9’da görülmektedir.

Dactylis glomerata ve standart olarak kullanılan *Vicia sativa* bitkisine ait G1 piklerinin birbirine göre pozisyonları Şekil 4’te, G1 piklerinin flow sitometri paket programı tanımlanmış hali ise Şekil 5’te verilmiştir.

Kamışsı yumak (*Festuca arundinaceae*) Çekirdek DNA Miktarları

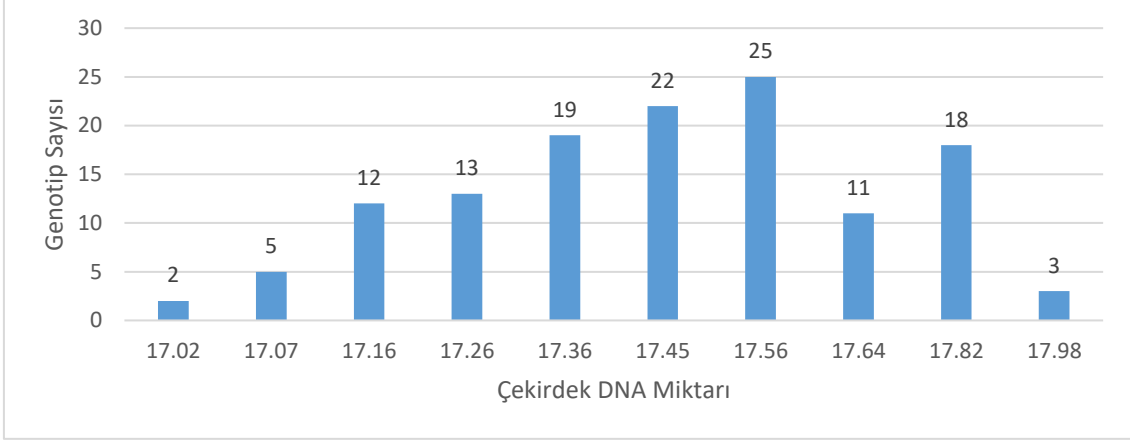
130 adet kamışsı yumak genotipi analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Festuca arundinaceae* genotiplerinin ortalama çekirdek DNA içeriği 17.47 pg, çekirdek DNA içeriklerinin 17.02-17.98 pg arasında değiştiği, standart sapma değerinin 17.47 ± 0.23 ve değişim katsayısının % 1.3 olduğu belirlenmiştir. Standart sapma değerinin çok az değişmesi kamışsı yumak genotiplerinin çekirdek DNA miktarının çok yakın olduğunu ve ploidi düzeylerinin aynı olacağı anlamına gelmektedir.

Tanımlayıcı istatistik neticesinde çekirdek DNA içeriklerinin ortalaması, en küçük ve en büyük değerleri, standart sapmaları ve değişim katsayıları hesaplanmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Kamışsı yumak genotiplerin pikogram olarak tanımlayıcı istatistik değerleri

Tanımlayıcı İstatistik Değerleri	Pg
Ortalama Çekirdek DNA Miktarı	17.47
Standart Sapma	0.23
Çekirdek DNA içeriği En Küçük	17.02
Çekirdek DNA içeriği En Büyük	17.98
Arpa (standart) Ortalama Çekirdek DNA Miktarı	10.65
Genotip Adedi (n)	130
D.K (Değişim Katsayısı) (%)	1.3

130 adet kamışsı yumak genotipinin, çekirdek DNA miktarına karşılık gelen genotip sayılarını gösteren sonuç Şekil 10’da verilmiştir.



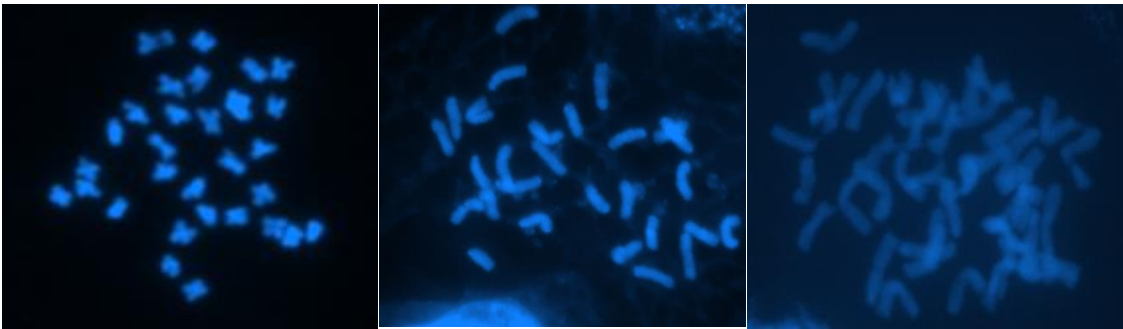
Şekil 10 Kamışsı yumak genotip sayılarına karşılık gelen çekirdek dna miktarları

51 adet genotipin 17.02-17.36 pg, 22 adet genotipin 17.45 pg ve 57 adet genotipin 17.56-17.98 pg arasında değiştiği görülmektedir.

Festuca arundinaceae ve standart olarak kullanılan *Hordeum vulgare* bitkisine ait G1 piklerinin birbirine göre pozisyonları Şekil 6’da, G1 piklerinin flow sitometri paket programı ile tanımlanmış hali ise Şekil 7’de verilmiştir.

Çekirdek DNA içeriği ile ploidi düzeyinin ilişkilendirilmesi

Çalışmamızda analiz edilmiş 80 adet ak üçgül, 80 adet domuz ayrığı ve 130 adet kamışsı yumak genotiplerinin çekirdek DNA içerikleri ile ploidi düzeyleri, tür bazında ayrı ayrı ilişkilendirilmiştir. Bu amaçla yapılan kromozom sayımlarında domuz ayrığı genotiplerinin $2n=4x=28$, ak üçgül genotiplerinin $2n=4x=32$ ve kamışsı yumak genotiplerinin $2n=6x=42$ kromozoma sahip oldukları belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre çalışmada kullanılan *Dactylis* ve *Trifolium* genotiplerinin tetraploid, *Festuca* genotiplerinin ise heksaploid olduğu saptanmıştır. Genotiplere ait mitoz kromozomlarının fotoğrafları $10 \times 100 = 1000$ kez büyütülerek Şekil 11’de verilmiştir.



Şekil 11 *Trifolium repens* (sol) Tetraploid ($2n=4x=32$), *Dactylis glomerata* (orta) Tetraploid ($2n=4x=28$), *Festuca arundinaceae* Hekzaploid ($2n=6x=42$) bitkilerine ait mitoz kromozomlarının görünüşü

Türlerin taksonomik teşhisleri

Çekirdek DNA analizi sonuçlarına göre her tür içerisinde 5'er adet genotip taksonomik olarak incelenmiş ve teşhis edilmiştir. Yapılan taksonomik değerlendirmelerde tüm ak üçgül genotiplerinin *Trifolium repens* var. *repens*, tüm domuz ayrığı genotiplerinin *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* ve tüm kamışsı yumak genotiplerinin *Festuca arundinaceae* subsp. *arundinaceae* olduğu tespit edilmiştir.

Tartışma

Ak üçgül (*Trifolium repens*)

80 adet ak üçgül genotipinin ortalama çekirdek DNA içeriğinin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Sitolojik incelemeler neticesinde, çekirdek DNA içerikleri 2.22 pg/2C ile 2.44 pg/2C (Tablo 1) arasında yer alan genotiplerin, $2n=4x=32$ kromozom sayısına sahip tetraploid bitkiler oldukları belirlenmiştir (Şekil 11). Yapılan taksonomik değerlendirmelerde de genotiplerin, *Trifolium repens* var. *repens* olduğu teşhis edilmiştir. Araştırmalar neticesinde; Avrasya, Afrika ve Amerika orijinli önemli agronomik değere sahip 31 üçgül türünde çekirdek DNA içeriğinin 0.688 pg (*T. ligusticum*) -7.375 pg (*T. burchellianum*) arasında değiştiği bulunmuştur. *Trifolium* türlerinin çoğunun diploid, çok azının tetraploid ve çok nadir olarak yüksek ploidi seviyeleri görülmüştür. En yaygın temel kromozom sayısı (türlerin % 80'i) $x = 8$ olarak tespit edilmiştir [15]. Güney Amerika ve Avrasya orijinli 6 adet *Trifolium* türünde flow sitometri yöntemiyle çekirdek DNA miktarını *T. argentinense*, *T. polymorphum*, *T. pratense*, *T. repens*, *T. riograndense* ve *T. medium* türlerinde 0.91 pg-8.58 pg arasında bulmuşlardır [8].

Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, daha önce yapılmış olan çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Kullanılan bitki türleri, kullanılan standartlar, toplanan yer ve yükseltilerin aynı olmamasından dolayı bazı farklılıkların olduğu anlaşılmaktadır.

Domuz ayrığı (*Dactylis glomerata*)

80 adet domuz ayrığı genotipinin ortalama çekirdek DNA içerikleri birbirine yakın olup, 8.32 pg/2C ile 9.66 pg/2C arasında değişmektedir (Tablo 2).

Sitolojik incelemeler neticesinde, birbirine yakın çekirdek DNA içeriklerine sahip genotiplerin, $2n=4x=28$ kromozom sayısına sahip tetraploid bitkiler oldukları belirlenmiştir (Şekil 11). Taksonomik değerlendirmelerde ise genotiplerin *Dactylis glomerata subsp. glomerata* olduğu teşhis edilmiştir.

Yapılan araştırmalarda; İngiltere’de doğadan toplanan 18 domuz ayrığı popülasyonlarının 17’sini tetraploid ($2n=4x=28$), 1 tanesi diploid ($2n=2x=14$) olduğunu, DNA C içeriği olarak 17 tetraploid popülasyonun %28,7’sinin 4,35-5,60 pg arasında değiştiği diploid olanınsa 3,3 pg olduğu [4], İtalya ve Fransa’ nın bazı kısımlarında Domuz ayrığının 8 doğal popülasyonu ile yaptıkları araştırmada, yükseklikle DNA C değerleri arasında negatif bir ilişki olduğunu [7], Trakya bölgesi doğal florasından toplanan 57 domuz ayrığı popülasyonlarında flow sitometri yöntemiyle çekirdek DNA içeriklerini 9.24 pg/2C-9.9 pg/2C arasında ve ploidi seviyesini de $2n=4x=28$ tetraploid olarak [12], Kuzey Slovenya'daki Alplerin güneydoğu kesiminde farklı yüksekliklerde büyüyen beş doğal *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) popülasyonunu incelemiş, Ortalama 2C DNA değeri, 8.6 pg, *D. glomerata subsp. glomerata* tetraploid ($2n=4x=28$) olduğunu tespit etmişlerdir [14].

Araştırma sonuçlarının, daha önce yapılmış olan çalışmaların sonuçları ile yakın olduğu görülmektedir. Farklılıkların, kullanılan bitki türleri, kullanılan standartlar, toplanan yer ve yükseltilerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kamışsı yumak (*Festuca arundinaceae*)

130 adet kamışsı yumak genotipinin ortalama çekirdek DNA içerikleri birbirine yakın olup, 17.02 pg/2C ile 17.98 pg/2C arasında değişmektedir (Tablo 3).

Yapılan sitolojik incelemelerde, belirtilen miktarlar arasında yer alan genotiplerin, $2n=6x=42$ kromozom sayısına sahip hekzaploid bitkiler oldukları belirlenmiştir (Şekil 11). Taksonomik değerlendirmelerde ise genotiplerin *Festuca arundinacea subsp. arundinacea* olduğu teşhis edilmiştir.

Bilimsel çalışmalarda; Değişik Avrupa ülkelerinden toplanan *Festuca* türlerine ait 205 örnekte flow sitometri yöntemi kullanılarak ploidi seviyelerini *F. alpestris* $2n=2x$; *F. amethystina* $2n=4x$; *F. billyi* $2n=6x$; *F. brevipila* $2n=6x$; *F. carnuntina* $2n=6x$; *F. cinerea* $2n=4x$; *F. degenii* $2n=4x$; *F. duernsteinensis* $2n=4x$; *F. duvalii* $2n=4x$; *F. gracilior* $2n=2x$; *F. lemanii* $2n=6x$; *F. ovina subsp. guestfalica* $2n=4x$; cf.*F. ovina* × *F. pallens* $2n=2x$; *F. pallens* $2n=2x, 3x, 4x$; *F. psammophila* $2n=2x$; *F.*

pseudodalmatica $2n = 4x$; *F. pseudovina* $2n = 2x$; *F. rupicola* $2n = 6x$; *F. stricta* $2n = 6x$; *F. vaginata subsp. dominii* $2n = 2x$; *F. vaginata subsp. vaginata* $2n = 2x$; *F. vaginata* \times *F. valesiaca* $2n = 2x$; *F. valesiaca* $2n = 2x$; *F. versicolor subsp. versicolor* $2n = 2x$; *F. wagneri* $2n = 4x$ olduğunu [9], 101 *Festuca* taksonu ve 14 yakın akrabasının çekirdek DNA içeriklerini flow sitometri ile belirlemiş ve cinsin içerisinde 2C çekirdek DNA içeriğinin 3.88 pg (*F. arvensis*) ile 24.08 pg (*F. gamisansii*) arasında değiştiğini ve ploidi düzeyi diploid ($2n=2x=14$) ile decaploid ($2n=10x=70$) arasında olduğunu [10], Doğu Anadolu Bölgesi dağlık bölgelerinden toplanmış olan *Festuca arundinaceae* sp. popülasyonlarında ortalama çekirdek DNA miktarlarını 4.51 pg/2C ile 15.03 pg/2C arasında ve ploidi düzeylerini diploid ile octoploid ($2n=14, 28, 42, \text{ ve } 56$) arasında değiştiğini tespit etmişlerdir [12].

Araştırmalar neticesinde elde edilen sonuçların, önceden yapılmış olan bazı çalışmaların sonuçlarıyla örtüştüğü bazılarıyla da örtüşmediği tespit edilmiştir. Örtüşmemesinin sebepleri, kullanılan bitki türleri, kullanılan standartlar, genotiplerin toplandığı yer ve yükseltelerin farklı olması olabilir.

Sonuç ve Öneriler

TAGEM projesi olan “Karadeniz Bölgesi Yem Bitkileri Islahı” projesi kapsamında sentetik varyete ıslahı yönteminin “kaynak popülasyon” aşamasında morfolojik ve tarımsal karakterizasyonla 2 buğdaygil türüne ait 210 adet ve 1 baklagil türüne ait 80 adet yem bitkisi genotipi seçilmiştir. Seçilen bu genotipler, TÜBİTAK 1002 projesinde kullanılmıştır. Bu çalışma yukarıda belirtilen genotiplerde çekirdek DNA içeriklerinin flow sitometri yöntemiyle belirlenmesi ve ploidi analizi ile tür teşhisinde kullanılması amacıyla yürütülmüştür.

Elde edilen sonuçlara göre, araştırmada kullanılan *Dactylis glomerata* genotiplerinin ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 9.12 pg (8.32 pg-9.66 pg); *Trifolium repens* genotiplerinin ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 2.33 pg (2.22 pg-2.44 pg); *Festuca arundinaceae* genotiplerinin ortalama 2C çekirdek DNA içeriği 17.47 pg (17.02 pg-17.98 pg) arasında değiştiği belirlenmiştir. Çekirdek DNA içerikleri ile genotiplerin ploidi düzeylerini ilişkilendirmek amacıyla yapılan kromozom sayımlarında domuz ayrığı genotiplerinin $2n=4x=28$, ak üçgül genotiplerinin $2n=4x=32$ ve kamışsı yumak genotiplerinin $2n= 6x=42$ kromozoma sahip oldukları belirlenmiştir. Elde edilen bu

sonuçlara göre çalışmada kullanılan *Dactylis* ve *Trifolium* genotipleri tetraploid iken *Festuca* genotiplerinin ise hekzaploid olduğu saptanmıştır. Ayrıca çalışmada kullanılan tüm genotipler çekirdek DNA içeriklerinin de yardımıyla taksonomik olarak teşhis edilmiş ve ak üçgülün *Trifolium repens* var. *repens*, domuz ayrığının *Dactylis glomerata* subsp. *glomerata* ve kamışsı yumağın da *Festuca arundinacea* subsp. *arundinacea* olduğu ve genotiplerin içerisinde başka türlere ait hiç bir bitkinin bulunmadığı belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar ile türlere ait genotipler arasında herhangi bir karışıklığın olmadığı tespit edilmiştir. Eğer karışıklık olsaydı ıslahın en başında türler içerisindeki genotipler, negatif seleksiyona tabi tutulacaktı. Türler için genotiplerde karışıklığın çıkmamasının sebebi, “kaynak popülasyon” içerisinde morfolojik ve tarımsal karakterizasyon ile ümitvar genotiplerin seçilmiş olması olabilir. Yine de her zaman bitkilerin fenotipine bakıp genotipi anlayamaz. Çünkü doğal floradan toplanan popülasyonlar, farklı tür ve ploidi düzeyine sahip bitkileri içerebilir. Bu karışıklığı gidermek için flow sitometri yöntemi özellikle morfolojik olarak birbirine çok benzeyen yem bitkilerinin teşhisinde ve ploidi düzeylerinin belirlenmesinde son derece güvenilir, hassas, kolay ve hızlı bir metottur.

Bu çalışmada, ıslah programlarında kullanmak amacıyla Orta Karadeniz Bölgesi doğal florasından toplanmış *Festuca arundinacea*, *Dactylis glomerata*, ve *Trifolium repens* genotiplerinin çekirdek DNA içerikleri flow sitometri ile ilk defa belirlenmiş ve ploidi düzeyleri, popülasyonların teşhislerinde kullanılmıştır. Karadeniz bölgesinde çalışılmış öncü çalışmalardan biridir ve bu alanda çalışan araştırmacılar için referans niteliğinde örnek olabilir.

Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK 218O099 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Anonim, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Toprak Gübre ve Su Laboratuvarı, Samsun, 2014.
2. Alay, F., K. İspirli, and N. Çankaya, Yıllara Göre Yem Bitkileri Ekiliş Alanları, Kaba Yem Üretimi, Tohum İthalatı ve İhracatı. SAMTİM, 2015. Sayı: 50 ISSN 1305-7588.
3. Ayan, İ., et al., Orta Karadeniz Bölgesi'nde Bazı Buğdaygil Yembitkilerinin Toplanması, Tanımlanması ve Kültüre Alınma Olanaklarının Araştırılması. 106 O 738 nolu TÜBİTAK Proje Sonuç Raporu, 2011.

4. Creber, L.H., et al., Variation in DNA C value in natural populations of *Dactylis glomerata*'' School of Pure and Applied Biology. University of Wales, PO Box 915, Cardiff CF1 3TL, 1994. 128, 555-561.
5. Davis, P.H. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. – Pp.:? in Davis PH (ed.) , Flora of Turkey and the East Aegean Islands 9. 1985. Edinburgh: Edinburgh University.
6. Elçi, Ş. and C. Sancak, Sitogenetikte Araştırma Yöntemleri ve Gözlemler, Ankara Üniversitesi Basımevi Yayınları, 2013. 978-605-136-121-5, 227.
7. Özbek, H. and S. Keskin, Standart sapma mı yoksa standart hata mı? Van Tıp Dergisi, 2007. 14(2): p.64-67.
8. Reeves, G., et al., Genome Size is Negatively Correlated with Altitude in Natural Populations of *Dactylis glomerata*. Annals of Botany, 1998. 82: p. 99–105.
9. Rizza, D. M., et al., Genetic diversity and DNA content of three South American and three Eurasiatic Trifolium species. Genet. Mol. Biol. 2007. vol.30 no.4.
10. Šmarda, P., et al., Ploidy level variability of some Central European fescues (*Festuca* subg. *Festuca*, Poaceae) Biologia. 2005. 60/1:p. 25—36.
11. Smarda P., et al., Genome Size and GC Content Evolution of *Festuca*: Ancestral Expansion and Subsequent Reduction. Annals of Botany, 2008. 101: p.421–433.
12. Tuna, M., et al., Cite as Characterization of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations of the Thrace Region of Turkey based on ploidy and DNA polymorphism. 2004. 135(1): p.39–46.
13. Tuna, S. G., et al., Flow Sitometri ile Çok Yıllık Buğdaygil Yem Bitkisi Genetik Kaynaklarının Karakterizasyonu. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2016. 25 (2):p.7-12.
14. Turan, İ. Temel İstatistik, <https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/2011>.
15. Vilhar, B., et al., Genome size and the nucleolar number as estimators of ploidy level in *Dactylis glomerata* in the Slovenian Alps. Plant Systematics and Evolution, 2002. 234(1):p.1–13.
16. Vižintin, L., B. Javornik, and B. Bohanec, Genetic characterization of selected Trifolium species as revealed by nuclear DNA content and ITS rDNA region analysis. Plant Science, 2006. 170(1),p.859-866.